



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM AMOSTRA DE TECIDO DE
PEIXE POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA
COM GERAÇÃO QUÍMICA DE VAPOR (CVG AAS) E
ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA ATÔMICA (AFS).**

JÚLIA DE SOUZA BARCELOS

Florianópolis

Novembro

2015

Júlia de Souza Barcelos

**DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM AMOSTRA DE TECIDO DE
PEIXE POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA
COM GERAÇÃO QUÍMICA DE VAPOR (CVG AAS) E
ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA ATÔMICA (AFS).**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientadora: VERA LÚCIA A. FRESCURA BASCUÑAN

Coorientadora: JESSEE SEVERO AZEVEDO SILVA

Florianópolis

11/2015

Júlia de Souza Barcelos

DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM AMOSTRA DE TECIDO DE PEIXE POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM GERAÇÃO QUÍMICA DE VAPOR (CVG AAS) E ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA ATÔMICA (AFS).

Prof. Dr. Alexandre Luis Parize
Coordenador de Estágio do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia A. Frescura Bascuñan
Orientadora.

Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha

Dr^a. Daiane Paula Cunha de Quadros

Florianópolis
Novembro / 2015

Ninguém percorre os caminhos da vida sozinho e por isso eu dedico essa conquista aos meus pais, Maria Terezinha de Souza Barcelos e Paulo Cesar Barcelos, que investiram e confiaram em mim. Sem o apoio de vocês essa conquista não seria real. Hoje a filha de vocês torna-se, cientista, Bacharel em Química.

“Procure ser uma pessoa de valor, em vez de procurar ser uma pessoa de sucesso. O sucesso é consequência.”

ALBERT EINSTEIN

AGRADECIMENTOS

O tempo estipulado pela UFSC para formar um químico é de 8 semestres, cá estou eu, desde o segundo semestre de 2009, foram 11 semestres cursados no total, pois no ano de 2011 me desliguei da UFSC. Sobre essa escolha, foi difícil decidir o que fazer “para o resto da sua vida” tão nova, esse período afastada serviu para formar melhor essa decisão.

Decidi voltar em 2012, fazendo ainda poucas disciplinas. Gosto de pensar que eu evolui, aceitei minhas dificuldades com o curso, corri atrás e consegui “domar” a química. Aprendi a estudar e esse foi o maior e mais difícil dos aprendizados que tive na vida.

Com o tempo consegui desenvolver técnicas para relacionar os conceitos e tentar integrar todos os “pacotinhos de conhecimento”, para formular explicações. Muitas dessas pensadas para responder as perguntas mirabolantes do meu namorado.

Era preciso aplicar para poder entender por completo todo esse mundo “diferente”, então larguei meu emprego e fui atrás de estágio. Foi a melhor coisa que fiz, foi muito difícil decidir por ganhar menos, voltar a depender completamente dos meus pais, já com 23 anos. Depois dessa decisão, deduzir fórmulas, contar elétrons, imaginar a disposição das ligações, prever mecanismos e interpretar espectros passaram a ser legal, passei a perguntar sem medo e buscar por respostas. Insistir, foi isso que eu fiz com a química e hoje estou imensamente feliz por estar me formando.

Durante essa minha caminhada de conhecimento, muitos colaboraram para meu desenvolvimento e por isso a todos que de alguma maneira me ajudaram, meu sincero agradecimento. Em especial aos meus pais, a quem dediquei essa conquista, minha irmã Mariana Barcelos e meu namorado Leandro Machado que acompanharam mais de perto tudo isso.

Agradeço muito a toda minha família que entendeu e respeitou a minha necessidade de estar ausente em alguns momentos importantes e comemorativos. Hoje eu estou colhendo os frutos disso.

Novamente quero agradecer aos meus maiores educadores, meus pais, vocês me ensinaram a ser forte sempre, mas chorar quando preciso. Acreditar na minha capacidade, tentar novamente quantas vezes for necessário, persistir e não desistir até que as forças estivessem esgotadas. Por vezes eu quase joguei a toalha, mas vocês me educaram a me cobrar demais para simplesmente desistir.

Aos amigos, que acompanharam a minha trajetória, tanto os que eu já tinha e levarei para a vida toda como Aline Bardini, alguns que fiz durante esses 7 anos morando em Floripa como Carolina Torres, os amigos da dança de salão: Bibiana, Matheus, Juliana, Felipe e os que vieram de brinde com o início do namoro como Tomasi.

Na Química, tenho tantos a agradecer, aos que me acompanharam durante esse longo período todo. Aqueles que desde o início me aguentam, como Yonara, Oséias, Sheila, Lilah, Mirela, Mariana e Nathy. Preciso agradecer também aos que eu conheci depois, meus calouros Anderson, Suelen, Renata Braz, Renata Menger, Kauê e Thalís que estão também me aturando a todo esse tempo e compartilhando dessa emoção de finalmente estarmos nos formando. Também agradeço aos que conheci quando retornei para o curso. Enfim tenho que agradecer a todos que toparam virar noites ou fins de semana estudando e responderam algumas mensagens desesperadas em busca de respostas em vésperas de prova, mas não vou citar todos os nomes para não esquecer de ninguém.

Na UFSC como um todo, quero agradecer aos membros dos grupos REMA, LabSelen e LEMA/LARES que colaboraram para o meu aprendizado e contribuíram para meu desenvolvimento como química.

Agradeço em especial à alguns membros do LEMA: A professora Vera por me acolher e aceitar me acompanhar nessa etapa final do curso e também por me “dar” a Jesse de presente, que me instruiu na programação e no desenvolvimento do trabalho. Agradeço também a Grazi, o Tarcísio, a professora Tati e o professor Daniel por me ajudarem com todos os problemas de funcionamento do equipamento.

De coração agradeço a todos os mestres que ajudaram no meu desenvolvimento, vocês contribuíram para o meu crescimento, como pessoa e profissional.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2.1 Química do Mercúrio	12
2.2 Métodos de detecção de Hg	13
2.2.1 Espectrometria de Absorção atômica	14
2.2.1.1 Espectrometria de absorção atômica com atomização em chama (F AAS)	15
2.2.1.2 Técnica de Geração Química de Vapor Frio (CV AAS)	15
2.2.2 Espectrometria de Fluorescência atômica com vapor frio (CV AFS)	16
2.3 Métodos de exatidão	17
2.3.1 Uso de Material de Referência Certificado	17
2.3.2 Uso de Métodos Certificados	18
2.3.3 Estudos Colaborativos.....	18
2.3.4 Recuperação de Analito	18
2.4 Preparo de amostra.....	18
2.4.1 Digestão ácida por micro-ondas	19
2.4.2 Suspensão.....	19
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo Geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4. METODOLOGIA.....	21
4.1 Instrumentação.....	21
4.2 Reagentes, padrões e amostras	21
4.3 Procedimentos analíticos.....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	23
5.1 Espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio	23
5.2 Espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio.....	30
6. CONCLUSÕES	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura de um espectrômetro de absorção atômica	14
FIGURA 2. Esquema do sistema óptico do CV AFS.	17
FIGURA 3. Otimização do agente redutor (A) sem e (B) com antiespumante para as amostras e padrão por CV AAS.....	25
FIGURA 4. Efeito do KMnO_4 no sinal de absorbância de Hg na amostra de estudo.....	27
FIGURA 5. Otimização do ácido clorídrico para geração do vapor atômico de Hg para amostra de estudo por CV AAS.....	29
FIGURA 6. Otimização do agente redutor SnCl_2 para geração de vapor das amostras e padrão.....	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Métodos conhecidos para detecção de mercúrio e seus limites	13
TABELA 2. Parâmetros de mérito.....	34
TABELA 3. Concentração de Hg em $\mu\text{g g}^{-1}$ ($n = 3$), intervalo de confiança 95%.	35

LISTA DE ABREVIATURAS

CONAMA - Conselho nacional do meio ambiente
CV AAS - Espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio
CV AFS - Espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio
GFAAS - Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite
ICP MS - Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado
ICP OES - Espectrometria de emissão atômica
INAA - Análise por ativação com nêutrons instrumental
LEMA - Laboratório de espectrometria atômica e de massa
LARES – Laboratório análises de resíduos sólidos
LOD - Limite de detecção
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MMA - Ministério do Meio Ambiente
CRM – Material de referência certificado
PNCRC - Programa nacional de controle de resíduos e contaminantes
RNAA - Análise por ativação com nêutrons radioquímica
RSD – Desvio padrão relativo

RESUMO

Foram realizadas otimizações para determinação de Hg por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor (CV AAS) e por espectrometria de fluorescência atômica (CV AFS) que incluem o preparo da amostra por suspensão para CV AAS e digestão por CV AFS, a concentração dos agentes redutores e de ácido clorídrico para a formação do vapor atômico e de KMnO_4 para estabilização do Hg^{2+} antes da reação com o agente redutor. Em ambas as técnicas a concentração de agente redutor (NaBH_4 para CV AAS e SnCl_2 para CV AFS) ótima foi de 2% m v⁻¹. O ácido clorídrico foi mais significativo para CV AAS do que para CV AFS. A determinação por CV AAS não foi possível, devido a falhas no equipamento e tempo insuficiente para o devido conserto. O método CV AFS apresentou limite instrumental de detecção de 0,13 ng g⁻¹, RSD de 1,8 µg g⁻¹ indicando a boa precisão do método. A exatidão foi avaliada através da submissão de um material de referência certificado (CRM DORM-3) ao método desenvolvido com resultado concordante com o certificado para um intervalo de confiança de 95% e o resultado obtido para a amostra de estudo foi corroborado por outros laboratórios participantes do ensaio interlaboratorial.

Palavras-chave: mercúrio, CRM, ensaio interlaboratorial, absorção atômica, geração de vapor, CV AAS, fluorescência, CV AFS.

1. INTRODUÇÃO

O aumento da poluição ambiental causado tanto pela ausência de tratamento correto dos lixos que possuem contaminantes, quanto pela ausência de fiscalização sob a emissão de poluentes realizada por empresas fabricantes desses objetos tem gerado preocupações quanto a exposição dos seres humanos. Alguns materiais de uso comum que contém mercúrio na sua composição são: pilhas, lâmpadas fluorescentes e conservantes de vacinas. Embora o mercúrio ocorra naturalmente no meio ambiente ele é um metal tóxico e existe de diversas formas. O mercúrio quando no mar proporciona a bioacumulação que é basicamente a absorção desse metal pelos animais marinhos, um outro fenômeno bastante comum é o de biomagnificação que ocorre ao longo da cadeia alimentar a medida que os predadores se alimentam de espécies já contaminadas com mercúrio. Como níveis elevados de mercúrio podem afetar o cérebro, o coração, os rins e os pulmões dos seres humanos, esses fenômenos são preocupantes e estimulam a sua quantificação em fontes alimentícias.

A amostra utilizada, tecido de peixe, foi utilizada em um estudo de interesse do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) que contempla a pesquisa de resíduos de medicamentos veterinários e de contaminantes inorgânicos em diversas matrizes. Esse estudo é parte de um ensaio interlaboratorial para produção de um material de referência certificado (CRM) proposto pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) objetivando a produção de material de custo acessível e matriz brasileira e como consequência possibilita certificar métodos analíticos que permitam a determinação de metais e ametais, entre eles o mercúrio. Possibilitando a quantificação para o controle dos teores destes elementos em amostras consumidas pela população em geral.

A maior parte dos estudos para quantificação de mercúrio utiliza a técnica de absorção atômica por ser capaz de quantificar a nível traço. O departamento de química da UFSC, conta com o LEMA, que desenvolve e aplica métodos para detecção de metais usando métodos de absorção atômica entre outros. O trabalho em questão foi todo desenvolvido nas dependências do mesmo e visou quantificar mercúrio total em amostra de tecido de peixe fazendo uso das técnicas de CV AAS e CV AFS com o interesse de comparação dos métodos e produção de uma CRM.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Química do Mercúrio

O mercúrio, elemento químico de número atômico 80, de aparência metálica e brilhante, que ocorre em estado líquido à temperatura ambiente é facilmente volatilizado para a atmosfera em forma de vapores de mercúrio. Uma vez introduzido no ambiente, o Hg apresenta um ciclo complexo composto da sua forma inorgânica: Elementar (Hg^0) metálico, principalmente encontrado como vapor, monovalente (Hg_2^{+2}) forma pouco estável naturalmente e bivalente (Hg^{+2}); Também de forma orgânica como metilmercúrio (CH_3Hg) e dimetilmercúrio [$(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$]¹

Algumas atividades econômicas e produtos apresentam elevados níveis de mercúrio como: mineração de ouro e de mercúrio, fábricas e recicladoras de lâmpadas fluorescentes, fábricas de termômetros, refinarias, clínicas dentárias, fábricas de pilhas e ainda em algumas vacinas como conservante. A exposição do ser humano a níveis elevados de mercúrio pode afetar o cérebro, o coração, os rins e pulmões e o sistema imunológico dos seres humanos. A toxicidade do mercúrio varia de acordo com a sua forma química e a principal forma de exposição das populações é através da dieta, em particular o consumo de pescados contaminados por metilmercúrio.¹

Nos sistemas aquáticos os fenômenos da bioacumulação e da biomagnificação do mercúrio ocorrem em espécies desde o fitoplâncton, passando pelo zooplâncton, peixes pequenos até seus predadores. Esta biomagnificação acontece através da cadeia alimentar e resulta por muitas vezes em uma maior concentração de Hg nestes organismos aquáticos do que no ambiente em que vivem.² No Brasil a concentração permitida de mercúrio em águas para criação de animais marinhos para consumo humano é de 0,0002 mg/L estabelecido pela resolução do CONAMA 357.³ Pensando nos problemas que a população está exposta a vigilância sanitária através do regulamento técnico MERCOSUL, sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos, determina as quantidades máximas de Hg em peixes sendo 0,50 mg/kg para os não predadores e 1,0 mg/kg para os predadores.⁴

2.2 Métodos de detecção de Hg

Estudiosos elaboraram uma comparação dos métodos mais utilizados para a detecção de mercúrio, que levaram em consideração a evolução, a aplicabilidade, bem como as vantagens econômicas e a sensibilidade dos mesmos. A Tabela 1 ilustra de maneira sucinta alguns dos mais explorados e seus limites de detecção.

A linha de pesquisa do grupo (LEMA) é para desenvolvimento de métodos para determinação por espectrometria de absorção e fluorescência atômica. Por esse motivo a revisão e estudos teóricos foram focados nesses métodos.

Tabela 1. Métodos conhecidos para detecção de mercúrio e seus limites de detecção.⁵

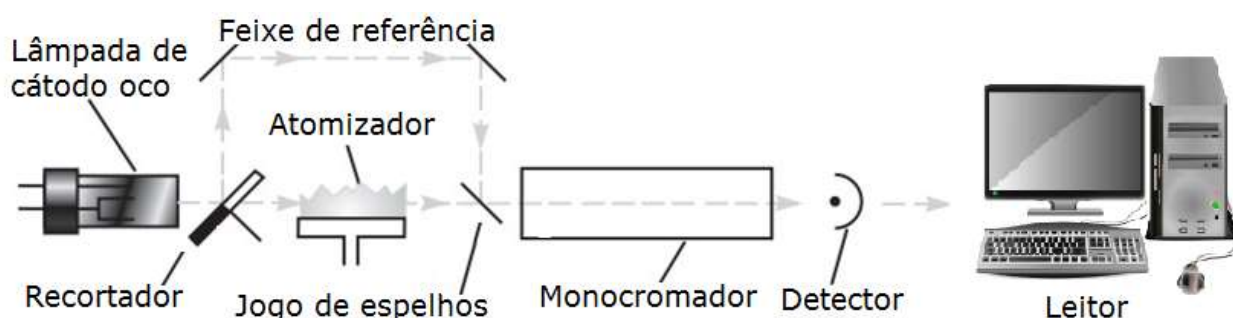
Métodos	Limite de Detecção
Método Colorimétrico	0,01 - 0,1 µg/g
Espectrometria de Absorção atômica	
Forno de grafite (GFAAS)	1 ng/g
Vapor frio (CVAAS)	0,01 - 1 ng/g
Espectrometria de Fluorescência Atômica	
Geração de Vapor Frio (CVAFS)	0,001 - 0,01 ng/g
Análise por ativação com Nêutrons	
Instrumental (INAA)	1 - 10 ng/g
Radioquímica (RNAA)	0,01 - 1 ng/g
Cromatografia gasosa	
Detector de Captura Eletrônica	0,01 - 0,05 ng/g
Detector de Emissão Atômica	~ 0,05 ng/g
Espectrometria de Massa	0,1 ng/g
CVAAS / CVAFS	0,01 - 0,05 ng/g
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	
Detector de Ultra-violeta	1 ng/mL
CVAAS	0,5 ng/mL
CVAFS	0,08 ng/mL
Eletroquímico	0,1 - 1 ng/mL
Plasma Indutivamente acoplado	
Espectrometria de Massa (ICP-MS)	0,01 ng/mL
Espectrometria de Emissão Atômica (ICP-OES)	0,01 ng/mL
Espectrometria Foto-Acústica	0,05 ng
Fluorescência de Raio-X	5 ng/g - 1 µg/g
Métodos Eletroquímicos	0,1 - 1 µg/g
Analizador de Filme de Ouro	0,05 µg/g

2.2.1 Espectrometria de Absorção atômica

Absorção atômica é um fenômeno quântico em que um átomo no estado vapor, átomo livre, absorve radiação eletromagnética, e isso gera a transição de um elétron de seu estado energético inicial para um estado de maior energia. Esta transição ocorre entre quaisquer níveis que a radiação possa suprir, desde que sejam obedecidas as regras de eleição específicas para os processos de absorção por átomos.^{6,7}

Para que esse fenômeno ocorra, a energia dos fótons da radiação eletromagnética deve ser exatamente igual à diferença energética entre o estado inicial e o estado promovido, caso contrário, não haverá excitação ou promoção eletrônica. A espectrometria de absorção atômica é uma técnica que utiliza este fenômeno para realizar a quantificação de elementos, como o mercúrio. Um espectrômetro de absorção atômica é composto basicamente por cinco componentes, sendo eles a fonte de radiação, o atomizador, o monocromador, o detector e o leitor, como representado na Figura 1.^{6,7}

Figura 1. Estrutura de um espectrômetro de absorção atômica.⁶



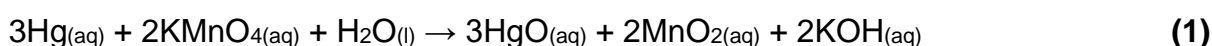
Os instrumentos de AAS com fonte de linha normalmente apresentam uma fonte de radiação específica para cada elemento, o que implica que apenas as linhas do próprio elemento sejam emitidas. O atomizador é o responsável pela formação de átomos livres (fase gasosa), necessária para que haja a absorção da radiação eletromagnética proveniente da fonte e incidida sobre a nuvem atômica do elemento de interesse. O monocromador seleciona as linhas que devem chegar ao detector, apenas as linhas de absorção no caso, e o detector transforma os sinais emitidos de energia magnética para energia elétrica e transmite ao leitor.⁸

2.2.1.1 Espectrometria de absorção atômica com atomização em chama (F AAS)

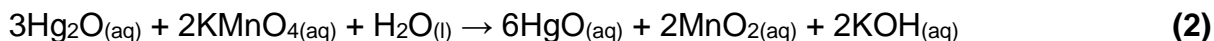
Em F AAS o atomizador, onde os átomos livres são produzidos, é uma chama formada pela ignição de uma mistura de um gás combustível (acetileno) e um gás oxidante (ar ou N₂O). A amostra (líquida) é introduzida na chama após a passagem por um nebulizador, que forma um aerossol (gás-líquido), e por uma câmara de nebulização, que seleciona gotículas de pequeno diâmetro, menor ou igual a 10 micrômetros.^{10,11} Quando uma amostra é carregada até a chama, ocorrem os processos de dessolvatação, vaporização, atomização, ionização e oxidação ao longo das diversas regiões de temperatura da chama. A região onde ocorre a atomização é a mesma onde ocorre a absorção da radiação proveniente da fonte e deve estar alinhada ao detector onde haverá a incidência e a detecção. Determinações de concentrações de analito na região de concentração de mg L⁻¹ são rotina para a maioria dos elementos. No entanto, a necessidade de análises de vestígios metálicos em µg L⁻¹, ou até níveis sub µg L⁻¹ exige uma técnica mais sensível, além disso alguns interferentes espectrais, como o cobalto, podem comprometer o resultado analítico.⁸

2.2.1.2 Técnica de Geração Química de Vapor Frio (CV AAS)

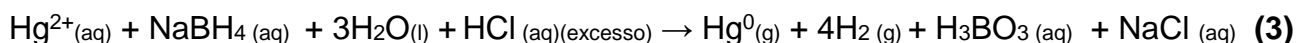
A geração química de vapor frio é uma técnica bastante sensível, que visa à transformação de espécies químicas em compostos voláteis à temperatura ambiente. Esta transformação ocorre através de reações químicas, envolvendo um ácido, um agente redutor, além do analito, para que posteriormente o vapor formado (espécie volátil do analito) seja transportado a uma célula de absorção mantida a temperatura ambiente, onde será feita a medida da absorvidade.⁹ Essa técnica limita-se à determinação de mercúrio e cádmio. O mercúrio no estado elementar tem pressão de vapor apreciável a temperatura ambiente, produzindo um volume suficiente de átomos na fase gasosa sem necessidade de tratamentos especiais. No entanto existe uma preocupação com a volatilização do Hg antes da análise, utiliza-se um estabilizador de mercúrio que oxida todo o mercúrio da amostra, transformando ele em mercúrio mercúrico, que posteriormente será reduzido a Hg⁰, a única forma do elemento que pode gerar vapor. A reação de oxidação do mercúrio elementar (Hg⁰) a mercúrio mercúrico (Hg²⁺) pelo KMnO₄ é mostrada na Equação 1.¹⁰



A reação de oxidação do íon mercurioso (Hg_2^{2+}) ao íon Hg^{2+} pelo KMnO_4 é mostrada na Equação 2.¹⁰



O procedimento envolve a introdução dos íons Hg^{2+} que são direcionados ao compartimento de reação, onde será reduzida a Hg^0 pela solução redutora de borohidreto de sódio e uma solução de ácido clorídrico.¹⁰ A reação entre o NaBH_4 e o HCl pode ser observada na Equação 3.¹⁰



O vapor atômico de mercúrio é então conduzido por um gás de arraste (argônio, Ar) para o compartimento da amostra, posicionado no caminho óptico do instrumento, onde absorve radiação em 253,7nm. A medida da absorção é feita no detector pela diferença entre a radiação que o atinge antes e durante a presença da nuvem atômica na célula.¹¹ No sistema em batelada o vapor atômico é formado pela injeção do agente redutor no frasco reacional contendo a amostra acidificada e é arrastado por uma corrente de argônio que borbulha na solução até a célula de absorção.¹¹ Esse método apresenta sensibilidade a cerca de $(0,01\text{-}1\text{ng/g})^4$, $(0,02\mu\text{g/L})^{-1}$.⁷ No sistema de fluxo as soluções da amostra, do ácido e do agente redutor são aspiradas continuamente até um reator onde ocorre a formação do vapor atômico que é separado da solução por um separador gás-líquido.¹²

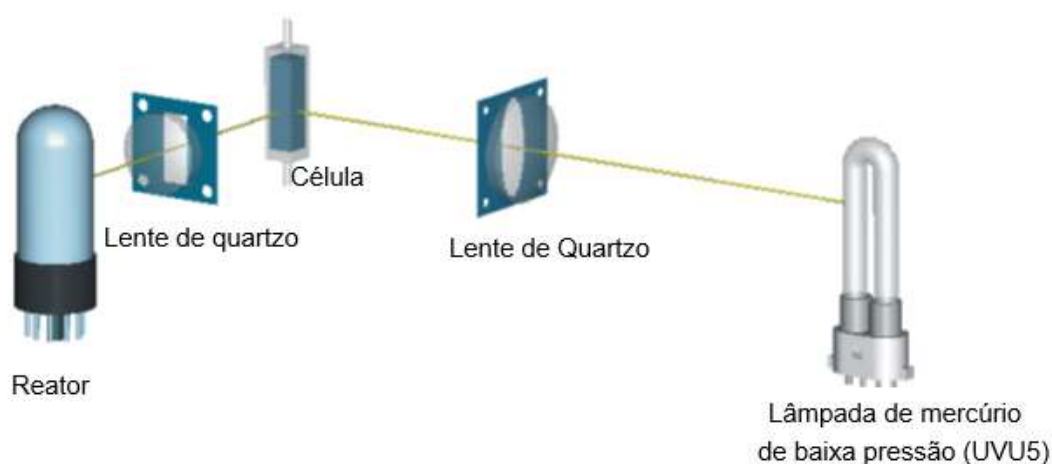
2.2.2 Espectrometria de Fluorescência atômica com vapor frio (CV AFS)

O princípio quântico é o mesmo que explicado anteriormente nos métodos de absorção, a diferença é que na fluorescência a transição eletrônica medida é na emissão e não na absorção de energia. Mercúrio é considerado um bom elemento para a fluorescência porque absorve e emite no mesmo comprimento de onda.⁵ O esquema do sistema óptico está representado na Figura 2. Este método é considerado mais sensível para a determinação do mercúrio, pois a detecção da energia emitida é feita perpendicularmente ao feixe de luz incidente, sendo medido com relação ao sinal de valor zero, e não como uma pequena variação de um sinal intenso, como no caso da CV AAS.¹³ Substâncias gasosas como CO/CO_2 , O_2 e N_2 causam interferência neste método.¹³ Assim como a CV

AAS, a CV AFS só detecta mercúrio na forma elementar (Hg^0), sendo assim, os compostos de mercúrio são convertidos a íons Hg^{2+} por agentes oxidantes.^{5,13} Posteriormente, o Hg^{2+} é reduzido a Hg^0 , através do uso de NaBH_4 ou SnCl_2 , podendo então ser pré-concentrado (ou não) em coluna de ouro.

A redução com NaBH_4 , apresentada anteriormente, mostra a formação de H_2 enquanto a redução com SnCl_2 como pode ser observada na Equação 5, não apresenta formação de H_2 e por isso exige a presença de um gás de arraste.¹⁴

Figura 2. Esquema do sistema óptico do CV AFS.



2.3 Métodos de exatidão

Entende-se por exatidão, a concordância entre os valores real e o estimado pelo processo analítico, na amostra, sendo a chave para a validação.^{15,16} Existem quatro métodos propostos para o estudo da exatidão, são baseados no uso de material de referência certificado (CRM), na comparação do método de estudo e um método de referência, no uso de ensaios de recuperação na matriz e em estudos colaborativos.¹⁷

2.3.1 Uso de Material de Referência Certificado

O processo de avaliação por meio de CRM baseia-se na comparação do valor certificado com o valor obtido pela análise de um número suficiente de replicatas desse mesmo material certificado. Porém, o alto custo do CRM, normalmente importado, e a limitação de matrizes e analitos restringem seu uso.¹⁷

2.3.2 Uso de Métodos Certificados

A exatidão pode se estabelecer mediante comparação, entre os valores obtidos para uma mesma amostra, usando o método em estudo e outro método de precisão e exatidão já avaliadas.¹⁶ Entretanto, existe dificuldade para encontrar método de referência para alguns elementos, impossibilitando a utilização dessa proposta.¹⁶

2.3.3 Estudos Colaborativos

Estudos colaborativos primeiramente precisam contar com a aceitação de no mínimo oito laboratórios em desenvolver determinado método, mas esse não é o principal motivo para o pouco uso dessa prova de exatidão, e sim a dificuldade encontrada para garantir a estabilidade do analito. O estudo torna-se particularmente difícil com compostos lábeis, que tem pouca estabilidade e transitam facilmente.^{15,17} Para esse processo de validação usa-se a análise de variância que determina a existência de diferenças significativas entre os valores obtidos pelos laboratórios envolvidos.¹⁶

2.3.4 Recuperação de Analito

A recuperação ou fator de recuperação (R) é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na amostra, recuperada por meio do método analítico.¹⁷ Trata-se da quantidade de analito efetivamente quantificada em relação à quantidade “real” presente na amostra. Quando a recuperação é obtida a partir da análise de CRM, calcula-se:

$$R\% = (C/C_{CRM}).100$$

onde: C é a média das recuperações obtidas para n repetições e C_{CRM} é a concentração verdadeira.¹⁷

2.4 Preparo de amostra

O processo de preparo da amostra é uma etapa crucial em um método analítico e deve ser realizado de maneira cuidadosa buscando a menor manipulação experimental possível, evitando assim contaminações e perdas do analito ao longo das etapas. É comum

o uso de digestão ácida como preparo de amostras sólidas, no entanto, existem outros métodos como extração e suspensão.

2.4.1 Digestão ácida por micro-ondas

A digestão de amostra usando um forno de micro-ondas é considerada um dos melhores procedimentos de preparo de amostra especialmente quando a técnica exige a completa dissolução da matriz da amostra ou a extração total dos analitos devido ao sistema de introdução, como por exemplo, os nebulizadores. A digestão é a decomposição de compostos inorgânicos em seus elementos constituintes, bem como a de orgânicos e organelas biológicas empregando-se ácidos minerais oxidantes e aquecimento.¹⁸ É comum o uso de ácido nítrico (HNO_3) sozinho ou combinado com outros reagentes, que tem alto grau de pureza e formam nitratos solúveis.⁹ A técnica apresenta algumas desvantagens como demora no preparo, riscos de contaminação (reagentes), perda de analitos voláteis, diluição da amostra além da possível solubilização incompleta.

2.4.2 Suspensão

Uma suspensão é definida como um sólido particulado finamente disperso em um meio líquido, de forma completa ou parcialmente insolúvel. Pode ser formada pela exposição da amostra em uma solução diluída de ácido nítrico. A análise de amostras sólidas em suspensão é associada a características como menor tempo de preparo de amostra, redução no número de etapas de preparo, e o controle da concentração é feito na própria pesagem da massa de amostra utilizada (menor que na maioria das técnicas), tornando-se desnecessárias eventuais diluições, reduzindo o uso e a quantidade de reagentes corrosivos e perigosos.^{19,20} No entanto a técnica apresenta a desvantagem da não homogeneidade e no caso de amostras orgânicas a formação de espumas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método para a determinação de Hg em amostra de tecido de peixe, utilizando as técnicas espectrométrica de absorção atômica com geração química de vapor frio (CV AAS) e espectrometria de fluorescência atômica (CV AFS), como parte de um ensaio colaborativo visando à produção de um material de referência certificado.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Desenvolver métodos de preparo das amostras por suspensão, para posterior determinação de Hg em amostra de tecido de peixe;
- ✓ Otimizar o preparo de amostra em forma de suspensão que inclui, massa da amostra, concentração de ácido nítrico, o uso de antiespumante, uso e concentração de agente estabilizador do Hg^{2+} .
- ✓ Otimizar parâmetros para a geração dos vapores de Hg tais como concentração de agente oxidante estabilizador de Hg, de agente redutor e de ácido clorídrico.
- ✓ Aplicar a metodologia analítica desenvolvida para determinação de Hg em material de referência certificada e posterior aplicação à amostra de estudo, garantindo assim a confiabilidade dos resultados;
- ✓ Comparação dos métodos desenvolvidos, CV AAS e CV AFS.

4. METODOLOGIA

4.1 Instrumentação

Os estudos e determinação de Hg foram desenvolvidos em um espectrômetro de absorção atômica modelo AANALYST 100 (Perkin Elmer, Norwalk, USA) equipado com um atomizador em chama e uma fonte de radiação, lâmpada de catodo oco operada no comprimento de onda 253,7 nm, e um detector fotomultiplicador, em compartimentos separados montado de forma linear. Para correção de fundo utilizou-se uma fonte contínua de deutério. Para a introdução da amostra e a geração do vapor atômico foi utilizado um acessório MHS15 (Perkin Elmer), acoplado ao espectrômetro. Uma célula de quartzo montada sobre a chama (apagada) foi utilizada. Para determinação por espectrometria de fluorescência atômica foi utilizado um espectrômetro de fluorescência atômica Mercur Duo (Analytik Jena, Jena, Alemanha), equipado com um reator PEEK com ângulo de incidência de 60° entre amostras/ácidos e o agente redutor, um separador gás líquido e uma membrana dessolvatada que usa argônio em contrafluxo, utilizado como fonte de radiação uma lâmpada de mercúrio de baixa pressão (UVU5) em comprimento de onda de 253,7 nm. Foi utilizado no processo de digestão das amostras um micro-ondas modelo Ethos Plus (Milestones, Sorisole, Itália). Argônio 99,96% puro (White Martins) foi utilizado como gás de arraste nas duas técnicas e em todas as pesagens uma balança analítica (Mettler, Toledo, Suíça) foi utilizada.

4.2 Reagentes, padrões e amostras

Todos os reagentes utilizados possuem no mínimo grau de pureza analítico. A água foi deionizada em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA) a uma resistividade de 18,2 MΩ cm. O destilador de quartzo (Kürner Analysentechnik, Rosenheim, Alemanha) foi utilizado na purificação por dupla destilação do ácido nítrico 65% (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha) e ácido clorídrico 37% (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). O boro-hidreto de sódio (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha) e hidróxido de sódio (Nuclear, São Paulo, Brasil) foram usados no preparo de soluções para geração de vapor pela técnica de CV AAS. E o cloreto estânico (Sigma Aldrich, USA) foi utilizado para a geração de vapor por CV AFS. O permanganato de potássio (Merck, Rio de Janeiro, Brasil) foi importante para a estabilização do Hg²⁺ nos dois métodos, o cloridrato de hidroxilamina (Merck, Darmstadt,

Alemanha) serviu para eliminar o excesso de permanganato de potássio. O padrão aquoso de Hg (SpecSol, São Paulo, Brasil) foi utilizado para as curvas de calibração. Também foi utilizado o material de referência certificado DORM-3 (NRC- National Research Council Canada) e a amostra de estudo, tecido de peixe, fornecida pelo responsável pelo estudo interlaboratorial, para os estudos e determinações.

4.3 Procedimentos analíticos

Para as otimizações por CV AAS a amostra foi preparada em forma de suspensão da seguinte maneira: 0,25 g da amostra de estudo, 3% HNO_3 , 0,25 % (m/v) KMnO_4 , 0,125% (m/v) HONH_3Cl e 0,2% antiespumante. E o agente redutor: 0,5 g de hidróxido de sódio e 1,0 g de Borohidreto de sódio para 50 mL.

Para a técnica de AFS as amostras foram submetidas a um programa de digestão em forno de micro-ondas. Primeiro 0,5 g da amostra de estudo e 0,5 g da DORM 3 foram pesadas e transferidas para os frascos, distintos, do forno micro-ondas, em cada frasco também foi adicionado 6mL de HNO_3 65% e 1mL de H_2O_2 30%. O programa utilizado no micro-ondas foi um indicado pelo fabricante, para amostra de peixe, e adotava uma série de cinco etapas baseadas na potência aplicada: primeiramente as amostras ficaram por 1 minuto submetidas a 250W, depois 1 minuto sem tensão nenhuma, 5 minutos novamente a 250W, 5 minutos a 400W e por último 5 minutos a 600W. Após o resfriamento a amostra foi transferida e avolumada para 50mL e em seguida foi vedada e armazenada sobre resfriamento.

Para a determinação por CV AFS o preparo das amostras deu-se da seguinte maneira: 2,5mL da DORM-3 digerida, 250 μL de HNO_3 (para garantir 1% do ácido na amostra), 0,050% (m/v) KMnO_4 , 0,025% (m/v) HONH_3Cl e foi avolumada para 50mL, uma diluição de 20 vezes; e 1,0mL da amostra de estudo digerida, 500 μL de HNO_3 (para garantir 1% do ácido na amostra), 500 μL de KMnO_4 , 250 μL de HONH_3Cl e foi avolumada para 50mL, ou seja, diluída 50 vezes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio

A técnica de geração química de vapor permite uma introdução diferenciada da amostra. Inicialmente a espécie de interesse é transformada em um composto volátil, através de uma reação química, e só depois transportada para a célula de atomização, no interior de uma célula de quartzo, localizada no caminho óptica, para medida de absorbância. Em CV AAS esse sistema de introdução foi utilizado para as amostras preparadas em forma de suspensão.

A técnica de suspensão não requer o uso de equipamentos sofisticados para o preparo da amostra, sendo assim de rápido e prático preparo. Inicialmente foram feitos testes baseados em estudos anteriores, então as amostras foram preparadas da seguinte maneira: 0,5g de amostra estudo ou 1,0g de material de referencia (DORM3). Com o objetivo de garantir a permanência do Hg em solução, 1% de ácido nítrico foi adicionado. Em seguida foi adicionado 0,25% (m/v) de permanganato de potássio (KMnO_4), que tem a função estabiliza todo o Hg^{2+} do meio, logo após 0,125% (m/v) de cloridrato de hidroxilamina foi adicionado para eliminar os excessos de KMnO_4 , que reduz o MnO_4^- , que possui coloração rosa, a MnO_2 , incolor. Depois de avolumada para 20 mL, a amostra foi submetida aos testes de detecção. E para a geração do vapor atômico foi utilizada novamente uma solução a 3% de Borohidreto de sódio com 0,2% (m/v) de NaOH e 0,5% HCl. Porém, as primeiras leituras emitiam sinais muito baixos, próximos da base. O que nos indicava que não poderia ser quantificado, para evitar o uso de uma massa maior de amostra, visto que a mesma era limitada, optamos então pela adição de padrão no preparo das amostras em todas as etapas de otimizações. A amostra foi então preparada da mesma maneira que anteriormente, adicionando apenas um volume de padrão correspondente a uma concentração final total de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg.

Durante as leituras desses primeiros testes, foi dado início a primeira otimização que foi a avaliação do tempo em três etapas importantes. Sendo o primeiro observado o de espera após a adição da amostra e ácido clorídrico no frasco reacional. Esse tempo é importante para garantir a eliminação do oxigênio ainda presente no frasco, essa eliminação acontece com o auxílio do gás de arraste (argônio) e foi observado pelo comportamento do corretor, que deixou de apresentar super-correção quando a espera foi de 5s. Em seguida o tempo de introdução do agente redutor foi observado, essa etapa é de grande importância

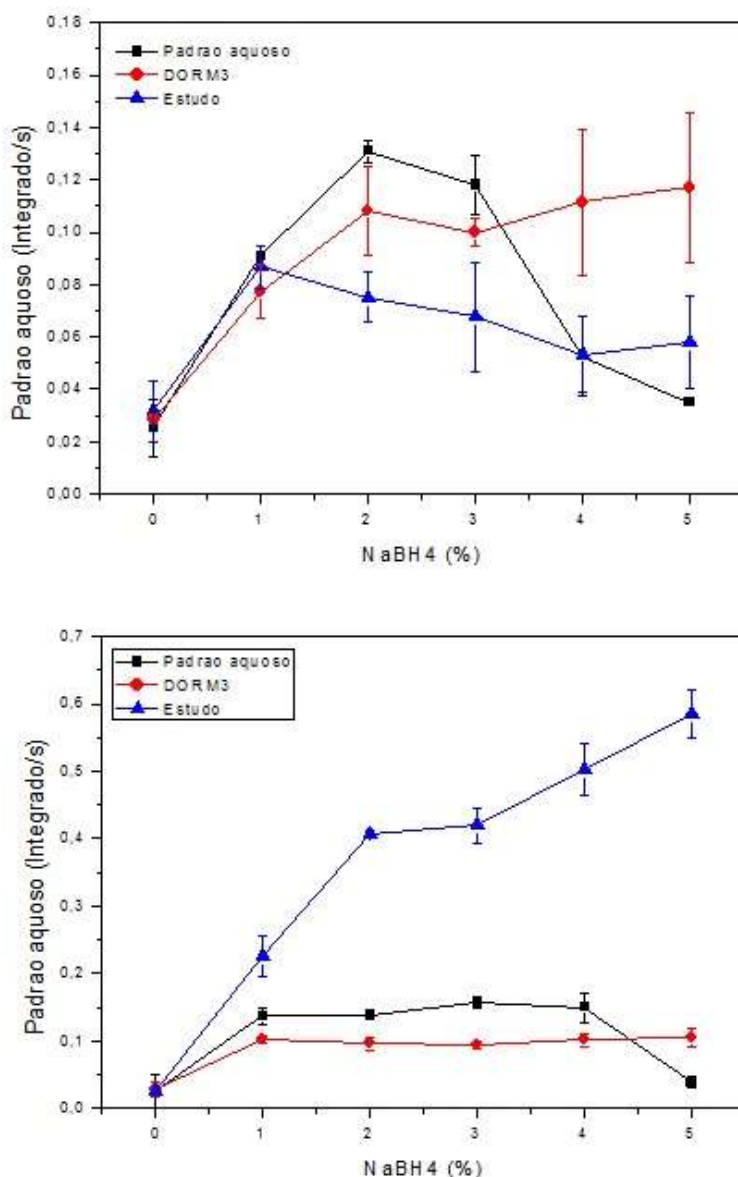
para garantir a injeção da mesma quantidade de NaBH_4 em todas as leituras. Durante os testes foi percebido que o injeto demorava 4s para iniciar o gotejamento da solução com agente redutor, isso justificou os sinais baixos e ruidosos gerados quando a injeção era de 5s, para obtenção de um sinal nítido e menos ruidoso foi necessário 10s de pressão ao injetor (garantindo 6s de gotejamento da solução). A otimização dos tempos foi finalizada com o tempo de integração do sinal analítico, referente à absorção da radiação pela nuvem de vapor atômico, era preciso garantir o retorno do sinal até a base e para isso o tempo estabelecido foi de 57s. Depois de observar as etapas individuais, o conjunto foi observado, o perfil do sinal foi bom, ele retornava para a base e a correção estava boa, então ficaram definidos 5s para eliminação de oxigênio, 10 s de adição do redutor e 57 s de integração.

A amostra foi preparada em forma de suspensão e para garantir que não só o sobrenadante fosse coletado é necessária a agitação da mesma, durante estes primeiros testes, notou-se que a agitação favoreceu a formação de espuma, especialmente para amostra de estudo, tecido de peixe. A formação de espuma é altamente indesejável visto que gera erros na medida do volume da amostra. A geração de espuma também ocorria, em grande quantidade, quando acontecia a introdução do agente redutor no frasco reacional, essa poderia estar sendo arrastada para a célula de quartzo, interferindo no sinal de absorção, ou ainda comprometendo o transporte do vapor atômico até a célula, o que também afeta o sinal analítico. Para minimizar essa interferência foi posto a testes o uso de antiespumante. Assim, 40 mg da amostra foi pesada e solubilizada em 2 mL de água ultrapura, em seguida foi adicionado, em alíquotas de 10 μL , solução 10% de antiespumante e agitado. Esse processo se repetiu até a não formação de espuma, o que ocorreu com 40 μL de antiespumante, ou seja, uma concentração final de 0,2% v/v.

Bom, o antiespumante foi eficiente em cessar a espuma da amostra, no entanto ainda não tinha-se observado possível interferência do mesmo. Objetivando o uso de calibração aquosa nas determinações e ainda avaliar a exatidão do método desenvolvido com uso de material de referência certificado, o mesmo preparo de amostra foi utilizado tanto para o padrão aquoso, quanto para a amostra de referência, como condição de compromisso, nas otimizações posteriores e para as determinações. Assim, as amostras e o padrão aquoso foram preparados com e sem adição de antiespumante. No preparo das suspensões foram utilizados os seguintes reagentes e quantidades: Para 30 mL de solução, 0,75 g (amostra estudo) ou 1,5 g (DORM-3), volume de padrão correspondente a uma concentração final total de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Hg, 1% HNO_3 , 0,25 % (m/v) KMnO_4 , 0,125% (m/v)

HONH₃Cl e 0,2% antiespumante. Além disso, uma solução 0,5% HCl para ser adicionado juntamente da amostra no frasco reacional e ainda as soluções de NaBH₄, que foram preparadas em concentrações entre 0 e 5 % (m/v), todas elas continham 0,2% (m/v) de NaOH, para estabilizar o agente redutor em solução aquosa. Os dados obtidos para a otimização do NaBH₄ estão representados em forma de gráfico na Figura 3.

Figura 3. Otimização do agente redutor (A) sem e (B) com antiespumante para as amostras e padrão por CV AAS.



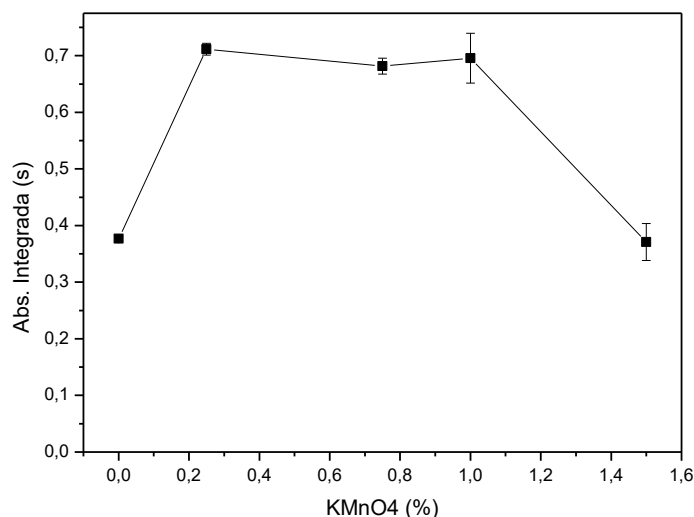
A Figura 3 (A) apresenta os resultados obtidos para as soluções sem o uso de antiespumante. Comparando o perfil das curvas obtidas pode-se observar que o borohidreto de sódio promove um significativo aumento na intensidade do sinal para as três

soluções, o que indica a presença do Hg^0 . Para a solução aquosa e material certificado este aumento ocorre até uma concentração de 2% do borohidreto e em seguida observa-se uma redução no sinal indicando que excesso do agente redutor é indesejável. Esta redução no sinal pode ser devida a um excesso de hidrogênio gerado também pelo excesso de borohidreto, o H_2 funciona como um gás de arraste, que ajuda a transportar o vapor de mercúrio para a célula de atomização, no entanto quando o NaBH_4 está em excesso produz muita espuma no frasco reacional, o que impede a passagem do analito, e com isso o H_2 pode estar se deslocando sozinho do frasco reacional até a célula de absorção, consequentemente o sinal analítico é baixo. Para a amostra estudo o aumento na intensidade de sinal ocorre até 1% de borohidreto e então ocorre redução no sinal. Além do possível excesso de hidrogênio gerado para maiores concentrações do agente redutor, a espuma formada pela própria amostra tanto na etapa de agitação quanto no frasco reacional podem contribuir para a redução no sinal de absorção. A Figura 3 (B) apresenta os resultados obtidos com o uso de antiespumante. Durante o desenvolvimento do estudo para otimizações do agente redutor nas soluções contendo o antiespumante, observou-se uma variação muito grande nos sinais obtidos para mesmas concentrações de agente redutor. Uma avaliação do instrumento mostrou que a lâmpada de cátodo oco apresentava oscilações na emissão da radiação e houve a necessidade de troca da mesma. Assim as otimizações de borohidreto para a solução aquosa e para o material certificado apresentados na figura 3B foram realizadas com uma lâmpada e a otimizações para a amostra estudo com outra. Isto explica a grande diferença nas intensidades observadas na figura. A intensidade de emissão da lâmpada mais nova sendo consideravelmente maior pode ter promovido uma maior absorção pela nuvem atômica gerando intensidades mais altas para a amostra estudo. No entanto, pode-se observar que o perfil das três curvas é muito similar. Para a solução aquosa e o material certificado o aumento nas intensidades ocorre até 1% de agente redutor e para a amostra estudo até 2%. O que é digno de atenção neste estudo é a estabilidade promovida pela presença do agente redutor para as três soluções ao longo de toda a faixa de concentração estudada. Ao que parece o antiespumante além de impedir a formação de espuma para a amostra estudo, contribui para uma melhor medida do volume da alíquota usada para a reação de geração do vapor atômico, minimizou a formação de vapores durante a reação, influenciando de maneira positiva para estabilização do sinal de absorção.

Durante os estudos iniciais fez-se o uso de 0,5% de KMnO_4 considerando que esta concentração estaria em excesso para a quantidade de Hg presente na amostra mais o padrão acrescentado, no entanto, no preparo da amostra de estudo a coloração, rosada, típica do permanganato desaparecia antes da adição do cloridrato de hidroxilamina indicando que todo o agente oxidante era consumido, possivelmente pela presença de interferentes na matriz da amostra. Essa evidência estimulou além da otimização do ácido nítrico, que já era prevista, uma avaliação sobre o efeito do KMnO_4 na suspensão da amostra estudo. Visto que o mesmo comportamento não foi observado para a solução aquosa e o material certificado o estudo não foi realizado para estes.

Para a otimização do agente oxidante, que tem como objetivo estabilizar o íon Hg^{2+} , 6 (seis) soluções (10 mL cada) foram preparadas e todas contendo 0,28 g amostra, volume de padrão correspondente a uma concentração final total de $100 \mu\text{gL}^{-1}$ de Hg, 1% HNO_3 , 0,2% antiespumante, a concentração de KMnO_4 variou de 0 a 1,5% (m/v) e a concentração de HONH_3Cl variou de 0 a 0,75% (m/v), sempre com estequiometria $\frac{1}{2}$, metade da percentagem de agente oxidante. Além disso, uma solução 0,5% HCl para ser adicionado juntamente da amostra no frasco reacional. A figura 4 apresenta a curva referente ao estudo da influência do agente oxidante, KMnO_4 , no sinal do analito.

Figura 4. Efeito do KMnO_4 no sinal de absorbância de Hg na amostra de estudo.



Os resultados obtidos mostraram que na ausência de KMnO_4 o sinal era baixo, tornando-se mais intenso quando a amostra era submetida a presença de agente

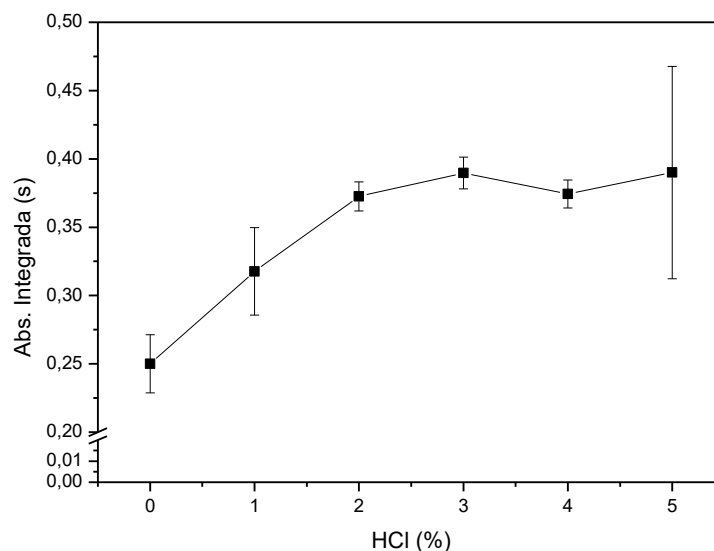
estabilizante. É possível perceber que quando a concentração estava entre 0,25% e 1% os sinais gerados apresentavam uma boa estabilidade, no entanto quando a concentração estava em 1,5% a intensidade apresentou queda. Esse aumento de intensidade ocorre devido ao poder desse agente oxidante que estabiliza o mercúrio presente na solução na forma de Hg^{2+} . Esse íon mercúrico estabilizado é submetido a ação do borohidreto em meio ácido, que proporciona a geração do mercúrio em sua forma elementar (vapor atômico). Com isso, pode-se dizer que a otimização foi eficiente em mostrar que 0,25% de KMnO_4 e por sua vez 0,125% de HONH_3Cl , em solução, são suficientes para estabilizar o mercúrio presente na amostra estudo. A mesma concentração de KMnO_4 foi adotado no preparo das soluções aquosas e do material certificado como condição de compromisso. Mesmo após a otimização do permanganato de potássio, observou-se que, para a amostra estudo, as intensidades ainda variavam significativamente e o sinal não voltava para a base. Acreditando que um aumento da concentração de HNO_3 poderia afetar a estabilidade dos sinais, sendo ele responsável pela extração de Hg da matriz da amostra, a otimização do HCL foi realizada com uma nova condição de HNO_3 .

O HCl utilizado para acidificar a amostra fornece H^+ para promover a formação do vapor atômico de Hg quando na presença do agente redutor. Para os estudos sobre o HCl, 50 mL de amostra estudo foram preparados, a solução continha 1,25 g da amostra de estudo, volume de padrão correspondente a uma concentração final total de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg, 3% HNO_3 , 0,25 % (m/v) KMnO_4 , 0,125% (m/v) HONH_3Cl e 0,2% antiespumante. Uma alíquota de 1mL da solução de amostra foi adicionada ao frasco de reação e o mesmo volume de uma solução de HCl, sendo que as concentrações variavam de 0 a 5 % do ácido clorídrico. A figura 5 ilustra os resultados obtidos, em forma de gráfico, para essa otimização.

Analisando os resultados é possível perceber que mesmo na ausência de ácido clorídrico o vapor era gerado e um sinal relativamente significativo era percebido, esse comportamento pode ser atribuído ao fato do meio já estar ácido, devido a presença de HNO_3 . A presença do ácido clorídrico, aumento a acidez no meio reacional o que proporcionou uma melhora no sinal analítico. Esse aumento foi percebido até 2%, depois disso até 5% o comportamento foi considerado constante e por isso 2% HCl ficou estabelecida como concentração mínima necessária tanto para a amostra estudo, para o padrão aquoso e para o material certificado, condição de compromisso. A concentração de 3% de HNO_3 favoreceu a redução do desvio padrão entre as medidas e promoveu um sinal

com um perfil bem mais definido. Assim a concentração de 3% HNO_3 foi adotada para o preparo da amostra.

Figura 5. Otimização do ácido clorídrico para geração do vapor atômico de Hg para amostra de estudo por CV AAS.



Findadas as otimizações, a proposta seguinte foi a construção de uma curva de calibração aquosa e outra com adição de analito a fim de comparar suas sensibilidades. Caso fossem parecidas, proceder as determinações usando uma curva de calibração aquosa. Como a nova lâmpada apresentava maior intensidade e o instrumento havia passado por uma manutenção pelo técnico especializado, este apresentava uma melhor sensibilidade, assim foram preparadas curvas de calibração com concentrações variando entre 0 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. No entanto, durante as medidas de intensidades das soluções de calibração, o acessório usado para a geração do vapor atômico e introdução deste na célula de quartzo do instrumento, (MHS 15), apresentou problemas no seu funcionamento. O vapor gerado não era arrastado, e não havia tempo hábil para o concerto do mesmo, por conta disso, as determinações de Hg por CV AAS não puderam ser realizadas.

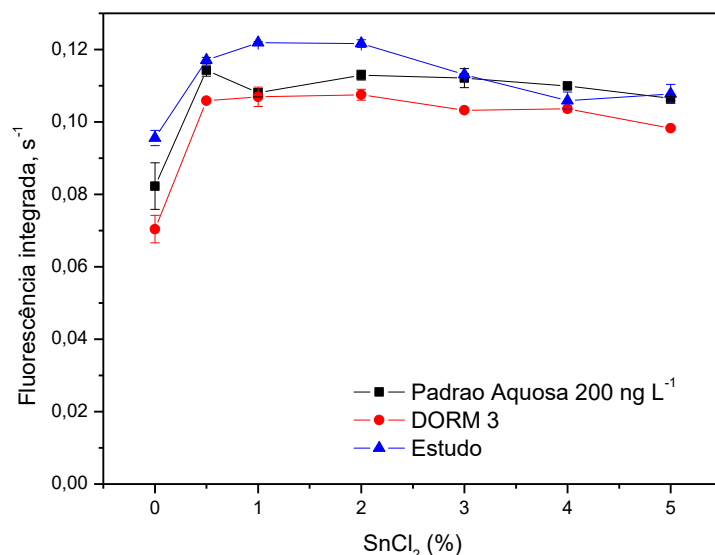
5.2 Espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio

A introdução da amostra e dos reagentes para formação do vapor atômico na técnica de fluorescência atômica dá-se de maneira contínua e simultânea. Existem três vias de transporte, uma para o ácido, outra para o agente redutor e a última para a amostra, um dos passos importantes no início das análises é conferir se o tempo de arraste das três vias é o mesmo. A amostra precisa ser líquida, para essa técnica e, por isso, fez-se necessária a digestão da amostra por forno de micro-ondas. Para a determinação de Hg por CV AFS o cloreto estanoso foi escolhido como agente redutor e as otimizações para avaliar a concentração que melhor promoveria a formação do vapor de Hg foi realizada. Para isso soluções com concentração entre 0,5% e 5% de SnCl_2 foram preparadas. A técnica de AFS é extremamente sensível, sendo a faixa de calibração da ordem de ng L^{-1} , assim a fim de garantir a eliminação de qualquer contaminação de Hg tanto as soluções de cloreto estanoso, quanto a solução de ácido clorídrico precisam, antes de dar início as análises, passar por um borbulhamento de ar comprimido por no mínimo 30 minutos. O preparo das amostras deu-se da seguinte maneira: 2,5mL da DORM-3 digerida, 250 μL de HNO_3 (para garantir 1% do ácido na amostra), 500 μL de KMnO_4 , 250 μL de HONH_3Cl e foi avolumada para 50mL, uma diluição de 20 vezes; e 1,0mL da amostra de estudo digerida, 500 μL de HNO_3 (para garantir 1% do ácido na amostra), 500 μL de KMnO_4 , 250 μL de HONH_3Cl e foi avolumada para 50mL, ou seja, diluída 50 vezes. Os resultados obtidos estão expostos em forma de gráfico na Figura 6.

Observando o perfil das curvas obtidas pode-se perceber a influência do SnCl_2 , por promover um significativo aumento na intensidade do sinal, quando presente, nas três soluções. No entanto esperava-se que a geração de vapor quando na ausência do agente redutor, fosse mínima (próxima de zero) e com isso um baixo sinal analítico no ponto 0% SnCl_2 , como observado no método de CV AAS. Esse comportamento pode ser esclarecido pelo fato do equipamento apresentar diversos compartimentos que possibilitam a formação de depósito sólido, no caso, do cloreto estanoso utilizado em outras leituras anteriores. Como a solução de 0% SnCl_2 transitou pelo mesmo percurso que as soluções quando com o agente redutor, a amostra quando chegou ao reator, possivelmente, entrou em contato com resíduos de SnCl_2 que promoveu a formação do vapor, resultando em sinal

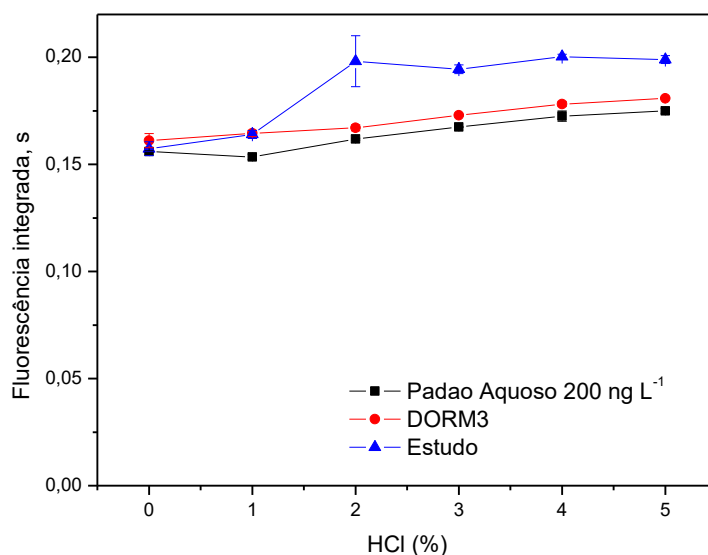
mesmo na ausência de agente redutor. Para a solução aquosa e o material certificado o sinal manteve-se estável a partir da solução com 0,5 % de agente redutor. Para a amostra estudo observa-se um ligeiro decréscimo para concentrações à partir de 3%. Sendo assim ficou estabelecido 2% m/v como concentração necessária de SnCl_2 para geração de vapor e foi adotada para as três soluções como condição de compromisso.

Figura 6. Otimização do agente redutor SnCl_2 para geração de vapor das amostras e padrão.



O estudo seguiu com a otimização da concentração de HCl , que tem como função a promover a formação do vapor atômico de Hg . Para essa otimização foi necessário preparar diferentes diluições do ácido clorídrico, os pontos escolhidos foram entre 1% e 5% de ácido. Novamente as soluções de ácido clorídrico e a solução de cloreto estanooso foram borbulhadas por 30 minutos com ar comprimido. As amostras seguiram com o mesmo preparo e as mesmas diluições: DORM-3 (20 vezes) e amostra estudo (50 vezes). Através da Figura 7 é possível analisar os resultados obtidos para esse estudo.

Figura 7. Otimização do ácido clorídrico para as amostras e padrão para a formação de vapor por CV AFS.



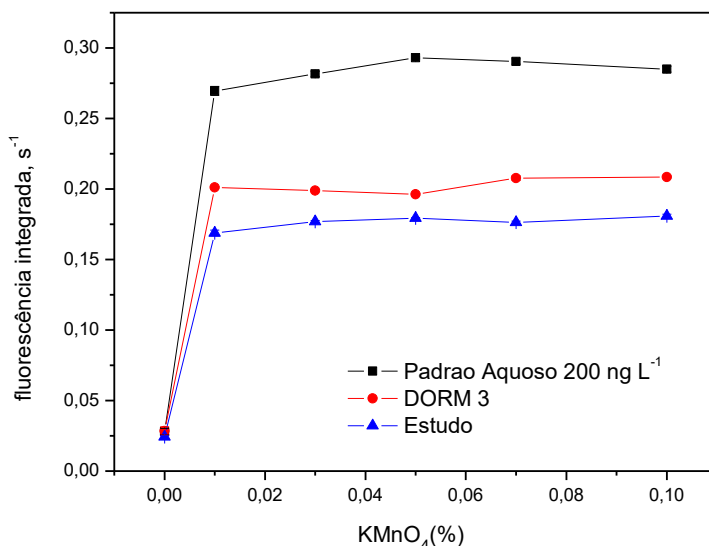
Para a geração de vapor é de fundamental importância que o meio seja ácido, para fornecer H^+ para o íon mercúrico, e gerar o vapor atômico, no entanto observando o perfil das curvas podemos caracterizar essa adição de ácido clorídrico como de pouca influência para a geração do vapor das amostras em questão. Esse comportamento pode ser explicado pelo preparo da amostra, como na digestão a amostra foi fortemente acidificada e mesmo após as diluições a amostra manteve-se 1% acidificada com HNO_3 . Além disso, a concentração de ácido clorídrico presente como estabilizante na solução do agente redutor. A adição desses ácidos foi quase que suficiente para garantir o meio ácido necessário para essa geração de vapor. Para a solução aquosa e a solução DORM-3 os sinais apresentaram-se constantes desde o início. No entanto para a amostra estudo observa-se um aumento na intensidade do sinal analítico quando a concentração do ácido foi de 2% e por isso foi escolhida como condição de compromisso para proceder as determinações.

Semelhante à técnica de CV AAS foi também realizada a otimização do agente oxidante para garantir a estabilidade do Hg^{2+} antes da reação com o agente redutor para a formação do vapor atômico. Vale salientar que para as soluções das amostras digeridas não foi percebido nenhum comportamento estranho, as soluções assumiam a coloração rosada, característica do permanganato, mesmo com a adição de concentração mínima

adotada para realizar os estudos, que representa excesso de KMnO_4 . Para as otimizações foram preparadas soluções com a concentração de agente oxidante entre 0,01% e 0,1% (m/v). Os resultados obtidos apresentam-se de maneira gráfica na Figura 8.

Observando o gráfico podemos perceber que a presença de permanganato de potássio é muito importante na geração do vapor de Hg, visto que o primeiro ponto (ausência de KMnO_4) mostra um sinal muito baixo, mas quando a concentração aumenta para apenas 0,01% o sinal apresenta aumento significativo na intensidade. Todos os pontos seguintes apresentaram variações mínimas, podendo caracterizar esse comportamento como constante. No entanto, como o maior sinal notado para a amostra de estudo foi em 0,05% e por ser, ainda, considerado baixa concentração, essa foi a condição estabelecida para KMnO_4 . Ainda analisando o gráfico é possível perceber uma intensidade um pouco maior para a solução de padrão aquoso, esse comportamento pode ser justificado pelo preparo do padrão ser feito sempre no dia das leituras, enquanto que as amostras foram digeridas e armazenadas para serem utilizadas em todos os processos de otimizações.

Figura 8. Otimização do KMnO_4 para as amostras e padrão por CV AFS.



Durante os estudos para desenvolvimento desse método (CV AFS), todas as otimizações foram realizadas, além da amostra estudo, com a amostra de referência e com o padrão aquoso, que apresentava comportamento semelhante a amostra de estudo, por esse motivo a construção de uma curva de adição de analito não mostrou-se necessária.

Após as otimizações, então, elaborou-se uma curva de calibração aquosa e para isso foram preparadas soluções com concentrações variando entre 25 e 400 ngL⁻¹. A tabela 2 apresenta os parâmetros de mérito obtidos. O limite de detecção LOD, definido como a menor quantidade de analito na amostra teste que pode ser distinguida de zero, e calculado como a razão entre três vezes o desvio padrão de dez medidas do branco pelo coeficiente angular da curva de calibração,^{20,21} foi 0,13 ng g⁻¹ indicando a boa sensibilidade instrumental. O desvio padrão relativo calculado como a razão entre o desvio padrão das medidas das replicatas das soluções da amostra analisada e a média obtida entre elas, depois multiplicada por 100,^{20,21} foi de 1,8 %, o que comprova a boa precisão entre as medidas obtidas pelo método.

Tabela 2. Parâmetros de mérito obtidos para a determinação de Hg em amostra de tecido de peixe por AFS.

Faixa de calibração (ngL⁻¹)	25 - 400
Coeficiente angular s L µg⁻¹	0,375
R	0,9998
LOD (ng g⁻¹)	0,13
RSD	1,8

Em seguida a amostra de tecido de peixe e o material certificado foram submetidas a análise e os valores de emissão atômica medidos foram relacionados com a curva de calibração para determinação da concentração de Hg. A tabela 3 expõe os valores obtidos, expressos como média e intervalo de confiança para um nível de 95% (n=3), para a amostra estudo e amostra de referência, bem como o valor certificado para a amostra DORM-3. Comparando o valor obtido para o material de referência e o valor certificado observa-se a boa exatidão do método desenvolvido. Os valores de concentração obtidos para a amostra estudo foram corroborados por outros laboratórios participantes do ensaio interlaboratorial, no entanto o resultado final ainda não foi divulgado.

Tabela 3. Concentração de Hg em $\mu\text{g g}^{-1}$ ($n = 3$), intervalo de confiança 95%.

Amostras	Valor obtido	Valor certificado
Dorm 3	$0,38 \pm 0,05$	$0,382 \pm 0,06$
Amostra estudo	$1,07 \pm 0,05$	

Os estudos realizados para o desenvolvimento do método de CV AFS foram realizados em parceria com, a também aluna da UFSC, Lucilene Aparecida Alves do Nascimento que faz parte do mesmo grupo de pesquisa (LEMA).

6. CONCLUSÕES

O trabalho foi desenvolvido em duas linhas de estudo e cada uma delas utilizou de diferente preparo de amostra, sendo suspensão para CV AAS e digestão por micro-ondas para CV AFS. Para a digestão foi utilizada a combinação HNO_3 e H_2O_2 que se mostrou eficiente, sendo que a solução não apresentava partículas sólidas no fim do procedimento. As suspensões exigiram um tempo maior de estudo e com ele constatou-se a necessidade do uso de antiespumante (0,2% v/v).

Os métodos utilizaram de diferentes agentes redutores, sendo NaBH_4 para CV AAS e SnCl_2 para CV AFS. As otimizações realizadas para os dois apresentaram (2% m/v) como condição adequada para geração do vapor de mercúrio. As otimizações realizadas para o ácido clorídrico, tanto para o CV AAS quanto para CV AFS apresentaram a concentração de HCl (2% v/v) como condição adequada para um bom sinal analítico.

Quanto as otimizações para o KMnO_4 , agente oxidante e estabilizador do íon Hg^{2+} , os resultados comprovaram comportamentos distintos para os dois métodos desenvolvidos. Sendo necessária uma concentração maior para a CV AAS (0,25% m/v) do que para a CV AFS (0,05% m/v), possivelmente devido à menor eficiência do meio usado para a suspensão em eliminar componentes da matriz e extrair todo o mercúrio, em comparação com processo de digestão por micro-ondas que promove a completa dissolução da amostra.

Todas as otimizações foram realizadas com sucesso, para ambos os métodos, no entanto a determinação por CV AAS não foi possível, devido a falhas no equipamento e ausência de tempo para seu devido conserto. Já o método de CV AFS mostrou-se muito sensível (LOD $0,13 \text{ ng g}^{-1}$). A determinação de Hg na amostra de referência mostrou boa concordância com o valor certificado dentro do intervalo de confiança (95%) e os dados obtidos para a amostra de estudo foram corroborados por outros laboratórios participantes do ensaio interlaboratorial.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MMA – Ministério do Meio Ambiente; Disponível em: <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/mercurio>; Acessado em: 12/05/2015.
2. Canela, M. C.; Determinação de mercúrio a nível traço: aplicação em amostras de interesse ambiental. Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo. Dissertação de Mestrado, 98p; 1995.
3. MMA – Ministério do Meio Ambiente; Disponível em: www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf; Acessado em: 20/05/2015.
4. ISO GUM - Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement; 2ª ed. brasileira (agosto de 1998) da 1ª ed. revisada em inglês de 1995 (ISBN:92-67-10188-9); INMETRO/ABNT/SBM/RH Metrologia; Guia para expressão da incerteza de medição.
5. Horvat, M.; "In Global and Regional Mercury Cycles: Sources, Fluxes and Mass Balances, Baeyens, W. et al., 1996.
6. Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., Crouch S. R.; Princípios de análise instrumental, tradução da 6ª edição; Porto Alegre, Bookman, 2009.
7. Beaty, R. D., Kerber, J. D.; Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry; 2ª ed; The Perkin-Elmer Corporation.
8. Souza, V. T. R.; Determinação de cromo em alimentos em suspensão por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica; Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.
9. Andrade, R. M.; Determinação de mercúrio em materiais de referência certificados de amostras biológicas por espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio após tratamento com hidróxido de tetrametilamônio; Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.
10. Grinberg, P.; Campos, R. C.; Pereira, H. B.; Luna, A. S.; Takase, I., A geração química de vapor em espectrometria atômica, Química Nova, Vol. 25, No. 6B, 1132-1144, 2002
11. Vogel, A.I., Química Analítica Qualitativa, Editora Mestre Jou, São Paulo, 1981.
12. Maranhão, T. A., Silva, J. S. A., Andrade, R. M., Bascuñan, V. L. A. F., Oliveira, F. J. S., Curtius, A. J.; Determination of As and Hg in acetic acid extract by vapor generation coupled to atomic spectrometry for solid waste classification; Microchemical Journal, Elsevier, 2012.

13. Westö, G.; Determination of Methylmercury Compounds in Foodstuffs. I. Methylmercury Compounds in Fish; Identification and Determination, *Acta. Chem. Scand.* 1968, 22, 2277.
14. Barbour, R.; Avaliação crítica dos métodos analíticos para determinação de arsênio e mercúrio em amostras de ácido sulfúrico de uma metalúrgica de cobre; Universidade Federal da Bahia, Salvador; Dissertação de Mestrado, 2007.
15. Francotte, E.; Davatz, A.; Richert, P., Development and validation of chiral high-performance liquid chromatographic methods *B*, v. 686, p. 77-80, 1996.
16. Amarante Jr., O. P.; Caldas, E. P. A.; Brito, N. M.; Santos, T. C. R. dos; VALE, M. L. B. F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. *Cad. Pesq.*, v. 12, p. 116-131, 2001.
17. González, A. G.; Herrador, M. A.; Asuero, A. G. Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. *Talanta*, v. 48, p. 729-736, 1999.
18. Gilman, L. G. N., Revesz, L. R.; Preparation of Environmental Samples for Metal Analysis Using Microwave Digestion, CEM Co., Matthews, NC, 1993.
19. Amorim, F. R., Franco, M. B., Nascentes, C. C., Silva, J. B. B., Direct Determination of Molybdenum in Milk and Infant Food Samples Using Slurry Sampling and Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, *Food Analysis Methods*, v. 4, p. 41-48, 2011.
20. Dobrowolski, R., Determination of Ni and Cr in soils by slurry graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B*, v. 51, p. 221-227, 1996.
21. INMETRO. DOC-CCGRE-020 - Definições de termos utilizados nos documentos relacionados à acreditação de laboratório. Disponível em: www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf; Acessado em: 20/05/2015.